

Japanese Patent Application No. 75427/1983

Date of Application: April 28, 1983

Japanese Patent Public Disclosure No. 204175/1984

Date of Disclosure: November 19, 1984

Inventors: T. Wakabayashi and two others

Applicant: TERUMO CORP.

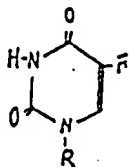
SPECIFICATION

1. Title of Invention

5-Fluorouracil derivatives, platelet aggregation inhibitors using said derivatives, and cancer metastasis preventives using said derivatives

2. Claims

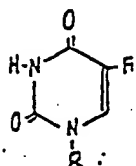
(1) A 5-fluorouracil derivative represented by the general formula:



(where R is an acyl group derived from a hexaenoic higher aliphatic acid).

(2) A 5-fluorouracil derivative according to claim 1, wherein R is an acyl group derived from 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid.

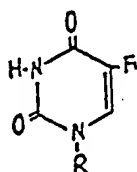
(3) A platelet aggregation inhibitor using a 5-fluorouracil derivative represented by the general formula:



(where R is an acyl group derived from a hexaenoic higher aliphatic acid)

(4) A platelet aggregation inhibitor using a 5-fluorouracil derivative according of claim 3, wherein R is an acyl group derived fro 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid.

(5) A cancer metastasis preventive using a 5-fluorouracil derivative represented by the general formula:



(where R is an acyl group derived from a hexaenoic higher aliphatic acid).

(6) A cancer metastasis preventive using a 5-fluorouracil derivative according to claim 5, wherein R is an acyl group derived from 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid.

3. Detailed Description of Invention

I. Background of the Invention

Technical Field

The present invention relates to 5-fluorouracil derivatives, platelet aggregation inhibitors using said derivatives, as well as cancer metastasis preventives using said derivatives.

The 5-fluorouracil derivatives provided by the present invention are novel compounds and having a potent platelet aggregation inhibiting action, they are useful as cancer metastasis preventives. They are also useful as cancer control agents.

Prior Art

5-Fluorouracil is known to have a salient cancer control action. As for 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid, it has been reported that this compound is abundant in fish oils.

The present inventors synthesized hexaenoic higher aliphatic acid amides of 5-fluorouracil and intensively studied their pharmacological activities. As a result, it has been found that the amides have a salient platelet aggregation inhibiting action and a cancer metastasis inhibiting action.

II. Objects of the Invention

An object of the present invention is to provide novel 5-fluorouracil derivatives useful as platelet aggregation inhibitors and cancer metastasis preventives.

Another object of the present invention is to provide

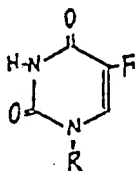
5-fluorouracil derivatives that are particularly useful as cancer metastasis preventives.

Yet another object of the present invention is to provide 5-fluorouracil derivatives useful as cancer control agents.

III. Specific Description of the Invention

There objects of the present invention can be attained by the techniques set forth below.

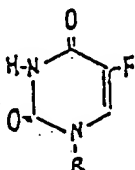
Thus, the present invention relates to a 5-fluorouracil derivative represented by the general formula:



(where R is an acyl group derived from a hexaenoic higher aliphatic acid).

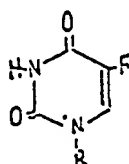
In the general formula set forth above, R is desirably an acyl group derived from 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid.

The present invention also relates to a platelet aggregation inhibitor using a 5-fluorouracil derivative represented by the general formula:



(wherein R is an acyl group derived from a hexaenoic higher aliphatic acid).

Further, the present invention relates to a cancer metastasis preventive using a 5-fluorouracil derivative represented by the general formula:



(where R is an acyl group derived from a hexaenoic higher aliphatic acid).

In the general formula for the 5-fluorouracil derivatives which are provided by the present invention, R represents an acyl group derived from a hexaenoic higher aliphatic acid and it signifies a group that is left by removing a hydroxyl group from a higher aliphatic acid having six cis-form double bonds in the carbon chain. Preferred examples of the higher aliphatic acid are those having 22 - 24 carbon atoms.

The compound which is the most preferred as the 5-fluorouracil derivative represented by the general formula set forth above is 1-(4,7,10,13,16,19-docosahexenoyl)-5-fluorouracil.

The compound represented by the general formula set forth above can be produced by reacting a hexaenoic higher

aliphatic acid with 5-fluorouracil in the presence of a condensing agent or by reacting a reactive derivative of a hexaenoic higher aliphatic acid with 5-fluorouracil.

Examples of the condensing agent include 2-chloro-1-methylpyridinium p-toluenesulfonate and 2-bromo-1-methylpyridinium iodide. Exemplary reactive derivatives of a hexaenoic higher aliphatic acid include acid anhydrides and esters of N-hydroxysuccinimide.

The 5-fluorouracil derivatives of the present invention are characterized by having a platelet aggregation inhibiting action. The 5-fluorouracil by having a platelet aggregation inhibiting action. The 5-fluorouracil derivatives of the present invention can be used as cancer metastasis preventives or cancer control agents; the dose varies with the severity of the disease and the daily dose ranges from about 0.1 to about 5 g per adult and, depending on the need, the administration may be done once, twice or three times a day. The route of administration may be peroral or by intravenous or subcutaneous injection.

The compounds of the present invention are mixed with pharmaceutical carriers or excipients by conventional methods such that they are formulated as tablets, powders, capsules or granules. Exemplary carriers or excipients include calcium phosphate, corn starch, potato starch, sugar, lactose, talc, magnesium stearate and gum arabic. Coatings may be applied to tablets in accordance with the usual method. Besides the solid dosage forms described

above, the compounds of the present invention may be formulated as liquids, for example, oil-base suspensions and syrups.

The compounds of the present invention have six double bonds in the molecule, so they permit the incorporation of α -tocopherol, α -tocotrienol, etc. as stabilizers. Alternatively, the compounds of the present invention may be stabilized by encapsulation with cyclodextrin.

The present invention will now be described more specifically by reference to a working example and test cases.

Examples

4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid (361 mg) was dissolved in anhydrous 1,2-dichloroethane (5 ml) in an argon stream; to the solution, 2-chloro-1-methylpyridinium p-toluenesulfonate (363 mg), 5-fluorouracil (143 mg) and triethylamine (245 mg) were added sequentially, and the resulting mixture was stirred at room temperature for 24 h. After concentration the reaction solution, n-pentane (10 ml) and water (5 ml) were added and the mixture was stirred. Subsequently, the pH of the stirred mixture was adjusted to about 4 with 0.5 N oxalic acid, followed by extraction with n-pentane. The n-pentane layer was washed with saturated brine and dried with Glauber's salt. The extract was evaporated to dryness under vacuum and the residue was subjected to column chromatography using Sephadex LH-20 (30 g) and

1-(4,7,10,13,16,19-docosahexenoyl)-5-fluorouracil (287 mg, 59%) was obtained from the methylene chloride eluted fraction. This compound had the following physicochemical data:

IR(CHCl₃) ν max cm⁻¹ : 1725, 1680, 1325, 1260

NMR(CDCl₃) δ (ppm) : 0.97(3H,t,J=7.4Hz),

3.20(2H,t,J=7.1Hz), 5.38(12H,m,olefinic proton)

Test Cases

Platelet aggregation inhibiting action

Nine volumes of blood were withdrawing from a rabbit carotid artery using a syringe filled with a 3.8% sodium citrate solution (one volume). The blood sample was centrifuged to separate platelet rich plasma (PRP with 5×10^6 platelets per μ L). A portion (250 μ L) of the PRP was put into a cuvette and heated in a thermostatic chamber (37°C) for 2 min; thereafter, 20 μ L of 1-(4,7,10,13,16, 19-docosahexanoyl)-5-fluorouracil in solution (1.4×10^{-2} M ethanol solution diluted with a 1:3 mixture of Tris-buffered isotonic aqueous solution of sodium chloride and physiological saline) was added and the resulting mixture was incubated for 30 min; thereafter, 10 μ L of arachidonic acid (100 μ M) was added as an aggregation inducer and the aggregation of platelets was measured. The platelet aggregation induced by arachidonic acid could be 50% inhibited by 1-(4,7,10,13,16,19-docosahexanoyl)-5-fluorouracil at a

concentration of 9×10^{-5} M.

Cancer metastasis preventing effect

Lewis lung cancer cells (10^6) were diluted in physiological saline and inoculated under the skin of BDF₁ mice 5 weeks old after birth. Each of the control and test groups consisted of 6-8 mice. After 24 h of the transplantation, the mice were administered a 0.5% CMC suspension of 1-(4,7,10,13,16,19-docosahexanoyl)-5-fluorouracil (100 mg/kg) perorally for 5 consecutive days. The efficacy of the test compound was evaluated in terms of percent index of life survival relative to the control group. The result was 64% survival.

Percent index of life survival (ILS%)

$$= \frac{\text{Mean number of days of survival of the group treated} - \text{Mean number of days of survival of the control group}}{\text{Mean number of days of survival of the control group}} \times 100$$

IV. Advantages of the Invention

According to the present invention, there are provided 5-fluorouracil derivatives having cancer metastasis preventing and cancer control effects.

These compounds of the present invention are capable of markedly suppressing the platelet aggregating action induced by arachidonic acid. When these compounds were administered to mice transplanted with cancer cells, the

cancer metastasis was retarded and, in addition, the cancer cells diminished in size. A factor that may have been involved in these phenomena is the platelet aggregating action. In addition, the compounds of the present invention improve the bioavailability of 5-fluorouracil, particularly its absorption by the gut and, hence, they can be used as salient cancer control agents.

Further, the present invention provides a process for producing the above-described 5-fluorouracil derivatives.

It should also be mentioned that no particular abnormalities due to toxicity were found in the above-described test cases on the compounds of the present invention.

rectum. 0.2 ml of ethyl docosaheptaenate (II) is dosed three a week for further 25 weeks in the stomach. The tumour formation rate is 65%. A control using physiological saline soln. shows tumour formation rate of 79%. The total number of tumours is 40 compared to 64 for the control.

0/0

Title Terms: ANTICANCER; AGENT; REDUCE; SIDE; EFFECT; CONTAIN; DOCOSA; HEXA
; ENOIC; ACID; ESTER

Derwent Class: B05

International Patent Class (Additional): A61K-031/20; C07C-057/12

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B10-C04E; B10-G02; B12-G07

Chemical Fragment Codes (M2):

01 H7 H723 J0 J011 J171 J271 M210 M211 M212 M213 M214 M215 M216 M220
M221 M222 M225 M231 M232 M233 M262 M272 M281 M320 M416 M781 M903
M904 P633 8930-18001-U

Generic Compound Numbers: 8930-18001-U

?t 003925789/9

003925789/9

DIALOG(R) File 351:DERWENT WPI

(c)1997 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

003925789

WPI Accession No: 84-071333

XRAM Accession No: C84-030596

Anti-neoplastic complex prepn. from active agent and unsatd. fatty aci -
to give less toxic, more specific prod.

Patent Assignee: HIRAI H (HIRA-I)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
JP 59025327	A	19840209	JP 82133958	A	19820731		198412 B
JP 92049524	B	19920811	JP 82133958	A	19820731	A61K-031/71	199236

Priority Applications (No Kind Date): JP 82133958 A 19820731

Patent Details:

Patent	Kind	Lan	Pg	Filing Notes	Application	Patent
JP 59025327	A		4			
JP 92049524	B		5	Based on		JP 59025327

Abstract (Basic): JP 59025327 A

Prepn. of an antineoplastic complex (I) is by reacting antineoplastics (II) with 10-30C unsatd. fatty acids. (II) are e.g. aminoglycoside antibiotics including daunorubicin, doxorubicin and adriamycin. Arachidonic acid and docosaheptaenoic acid are the most suitable fatty acids. (I) is much less toxic, and is more effective against target cancer cells. In an example, 24.1 mg. of water-soluble carbodiimide were added to 10.3 mg. of arachidonic acid, the mixt. was dissolved in 3 ml. of DMF and 10.0 mg. of daunorubicin in 2 ml. of distilled water were added dropwise with stirring. The mixture was stirred for about 6 hrs., then adjusted to alkaline pH with 4N NaOH. The complex was extracted with 3 x 40 ml. of chloroform and the

extract was washed with distilled water, dried (Na₂SO₄) evaporated to dryness, then chromatographed on silica gel, and eluted with chloroform-acetone (7:3). The binding ratio of arachidonic acid to daunorubicin was 1:1.

Effect of this and other complexes on inoculated ascites hepatoma AH66 cells in rats was examined. In control rats, average duration of survival was 15 days. Average duration of survival in rats given daunorubicin or doxorubicin was 28 and 30 days, resp. In groups given various complexes, average duration of survival was more than 60 days.

Title Terms: ANTI; NEOPLASMS; COMPLEX; PREPARATION; ACTIVE; AGENT; UNSATURATED; FATTY; LESS; TOXIC; MORE; SPECIFIC; PRODUCT

Derwent Class: B03

International Patent Class (Main): A61K-031/71

International Patent Class (Additional): A61K-031/20; C07H-015/252

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B02-A; B02-D; B10-C04E; B12-G05; B12-G07

Chemical Fragment Codes (M2):

01 H7 H721 H722 H723 J0 J011 J1 J171 M220 M224 M225 M226 M231 M232 M233
M262 M281 M320 M416 M431 M782 M903

02 F012 F013 F014 F016 F123 G020 G022 G029 G034 G038 G420 H1 H100 H121
H4 H405 H421 H442 H461 H481 H5 H521 H541 H8 J5 J581 K0 L8 L817 L821
L834 L9 L951 M1 M126 M141 M210 M211 M240 M272 M281 M311 M321 M342
M349 M381 M391 M413 M431 M510 M521 M531 M540 M782 M903 M910 P633 V0
V041

03 F012 F013 F014 F016 F123 G020 G022 G029 G034 G420 H1 H100 H121 H4
H404 H421 H442 H461 H5 H521 H541 H8 J5 J581 K0 L8 L817 L821 L834 L9
L952 M1 M126 M141 M210 M211 M240 M262 M272 M281 M320 M413 M431 M510
M521 M531 M540 M782 M903 P633 V0 V041

Derwent Registry Numbers: 2028-U

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—25327

⑤ Int. Cl.³

A 61 K 31/71

31/20

// C 07 H 15/24

識別記号

A DU

庁内整理番号

7169—4C

7330—4C

7252—4C

⑬ 公開 昭和59年(1984)2月9日

発明の数 1

審査請求 未請求

(全 4 頁)

⑭ 抗腫瘍性複合体の製造方法

⑯ 特 願 昭57—133958

⑰ 出 願 昭57(1982)7月31日

特許法第30条第1項適用 昭和57年7月25日

発行日本癌学会の「日本癌学会総会記事第41

回総会(大阪)昭和57年8月」に発表

⑱ 発 明 者 平井秀松

札幌市中央区界川3丁目9番5

号

⑲ 発 明 者 ドイチエ・エツチ・エフ

米国53508ウイスコンシン州ベ

ル・ビル・パーセル・ロード64

01 Rt.1

⑳ 出 願 人 平井秀松

札幌市中央区界川3丁目9番5

号

㉑ 代 理 人 弁理士 高島一

明 細 書

1. 発明の名称

抗腫瘍性複合体の製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) 抗腫瘍性化合物と炭素数10～30の不飽和脂肪酸又はその反応性誘導体とを反応させることを特徴とする抗腫瘍性複合体の製造方法。

(2) 抗腫瘍性化合物がアミノグリコシド系抗腫瘍性化合物である特許請求の範囲第(1)項記載の抗腫瘍性複合体の製造方法。

(3) アミノグリコシド系抗腫瘍性化合物がダウノルビシン又はトキソルビシンである特許請求の範囲第(1)項記載の抗腫瘍性複合体の製造方法。

(4) 炭素数10～30の不飽和脂肪酸がアラキドン酸又はドコサヘキサエン酸である特許請求の範囲第(1)項記載の抗腫瘍性複合体の製造方法。

(5) 抗腫瘍性化合物1モルに不飽和脂肪酸1モルを反応させてなる特許請求の範囲第(1)項記載の抗腫瘍性複合体の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、新規抗腫瘍性化合物の製造方法に関する。

今日、多くの有用な抗腫瘍剤が開発されている。例えばダウノマイシンは、強力な抗腫瘍性化合物で新生物細胞を死滅させるのに有効な薬剤となりうる。しかし、正常組織に対する毒性のゆえにその使用が制限されている。抗腫瘍性化合物の腫瘍細胞に対する選択性は、腫瘍部位へ薬剤が特異的に濃縮する様な方法をとることによつて強化される。この目的への一法として薬剤に種々の担体を用いる方法があり、担体としては抗腫瘍性抗体の他に、レクチン、リボソーム等が用いられている。

本発明者らは、上記と同様の目的を達成するため技術的多様化の観点から種々検討を重ねてきたところ、抗腫瘍性化合物を炭素数10～30の不飽和脂肪酸で化学修飾することによつて、抗腫瘍

性化合物の通常細胞に対する毒性が軽減されると同時に当該化合物の腫瘍部への標的効果の改良が見られることを見出し、本発明を完成したものである。

本発明は、抗腫瘍性化合物と炭素数10～30の不飽和脂肪酸又はその反応性誘導体とを反応させることを特徴とする抗腫瘍性複合体の製造方法からなる。

本発明にて使用される抗腫瘍性化合物は、抗腫瘍活性を有しかつ炭素数10～30の不飽和脂肪酸又はその反応性誘導体と反応性の基（以下、反応性基Aという）（たとえば、アミノ基、水酸基など）を有するものであればよい。かかる化合物としては、たとえばアミノグリコシド系化合物（たとえば、ダウノルビシン、ドキソルビシンなど）などがあげられる。

本発明にて使用される炭素数10～30の不飽和脂肪酸の好ましい炭素数は15～22であり、好適なものとしてはアラキドン酸、ドコサヘキサエン酸などがあげられる。当該脂肪酸の反応性誘

導体は、カルボキシル基における反応性誘導体であり、アシル化反応において一般的に使用されるものであればよく、たとえば酸ハライド（酸クロライド、酸ブロマイドなど）、酸無水物、混合酸無水物などが使用される。

本反応は、通常縮合剤（たとえば、水溶性カルボジイミドなど）の存在下に行われる。

抗腫瘍性化合物と炭素数10～30の不飽和脂肪酸との反応は、通常当該反応を阻害しない溶媒中で行われる。溶媒としては、たとえばジメチルホルムアミドなどの有機溶媒、水及びこれらの混合溶媒が使用される。pHは4～5であることが好ましく、反応温度は10～30℃、就中室温が好ましい。また反応時間は通常2～8時間である。

かくして得られる複合体における抗腫瘍性化合物と当該脂肪酸との結合割合は、抗腫瘍性化合物中の反応性基Aの数によつて決まり、たとえばダウノルビシン、ドキソルビシンはアミノ基を1個有するので抗腫瘍性化合物1モルに対して当該脂肪酸1モルがアミド結合されることになる。

複合体の分離・精製は、たとえば反応液をアルカリ性にして溶媒（たとえば、クロロホルム）抽出する方法、当該抽出液をカラムクロマトグラフィーにて抽出する方法（たとえば、シリカゲルカラムに於てクロロホルム：アセトン＝7：3で抽出すると複合体は先に抽出してくる）などがあげられる。

本発明の複合体は、いずれも新規化合物であり、原料抗腫瘍性化合物に較べて著しく軽減された腫瘍細胞への標的効果が上昇しているところからより有効な抗腫瘍剤として有用である。かかる医薬として使用する場合、原料抗腫瘍性化合物と同様の剤形として経口的または非経口的に投与することができる。また当該複合体の投与量は、原料抗腫瘍性化合物の投与量より少ない投与量でもかまわない。

以下、実施例、実験例を示して本発明を具体的に説明する。

実施例1

アラキドン酸10.3mgに水溶性カルボジイミド

24.1mgを加え、さらにジメチルホルムアミド3mlを加えて溶かす。攪拌下ダウノルビシンを10.0mg含有する水溶液2mlを滴下した。約6時間反応後、4N水酸化ナトリウムを加えて水溶液をアルカリ性にした後、反応液をクロロホルム40ml×3回で抽出した。最後に水で洗浄し Na_2SO_4 で脱水し、乾燥させた。これをクロロホルム：アセトン＝7：3の溶液に溶解し同溶液で平衡化したシリカゲルカラムで展開した（展開液も前記と同じクロロホルム・アセトン溶液）。フリーのダウノルビシンは吸着され、複合体は溶出される。

かくして得られた複合体の特性は次に示す通りである。

- (1) 紫外吸収スペクトルは第1図に示した。複合体のダウノルビシン量として14 μM である。第2図は対照群、即ちダウノルビシン単独（20 μM ）、ダウノルビシンと脂肪酸の混合物（各20 μM ）、脂肪酸単独（20 μM ）の各メタノール溶液の紫外吸収スペクトルであるが複合体にすると200～210nmの吸収が増

大される。

(2) アラキドン酸結合モル数：ダウノルビン
結合モル数 = 1 : 1

(3) エタノール、メタノール及びエーテルに可
溶性、水に不溶。

実施例 2

実施例 1 において、アラキドン酸の代りにドコ
サヘキサノイック酸を用いて同様に複合体を合成
した。

実施例 3

実施例 1 において、ダウノルビンの代りにド
キソルビンを用いて同様に複合体を合成した。

実験例

ラット腹水肝ガン A 11 6 G 細胞の 1×10^4 個
を雄ラット（体重 $150g \pm 10$ ；1 群 6 匹）の
腹腔内投与後、3、5、7 日目に種々の複合体及
び対照物を正常ラット血清に溶解しそれぞれの 2
 $00 \mu g$ 相当量を静脈内投与し、ラットの生存日数
の延長を調べた。その結果は次表に示す通りであ
る。

表

薬 剤	平 均 生 存 日 数	60 日経過後 の生存率
正常ラット血清	15 日	0 / 6
ダウノルビン	28 日	0 / 6
ドキソルビン	30 日	0 / 6
ダウノルビン ・アラキドン酸 複合体	60 日以上	5 / 6
ダウノルビン ・ドコサヘキサ エン酸複合体	60 日以上	6 / 6
ドキソルビン ・アラキドン酸 複合体	60 日以上	5 / 6

4. 図面の簡単な説明

第 1 図はダウノルビン-アラキドン酸複合体
（ダウノルビン量として $14 \mu M$ ）の紫外吸収ス
ペクトルを示し、第 2 図はダウノルビン単独（
 $20 \mu M$ ）、ダウノルビンと脂肪酸の混合物（各
 $20 \mu M$ ）、脂肪酸単独（ $20 \mu M$ ）の各メタノ

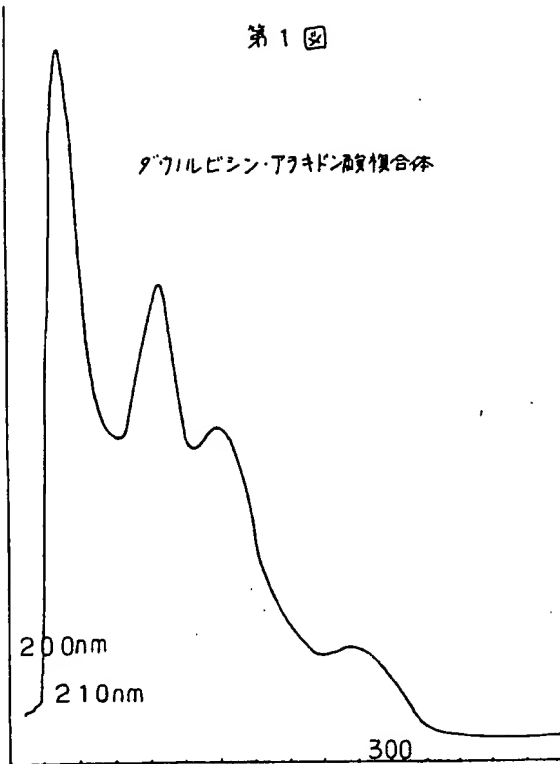
ール溶液の紫外吸収スペクトルである。

特許出願人 平 井 秀 松

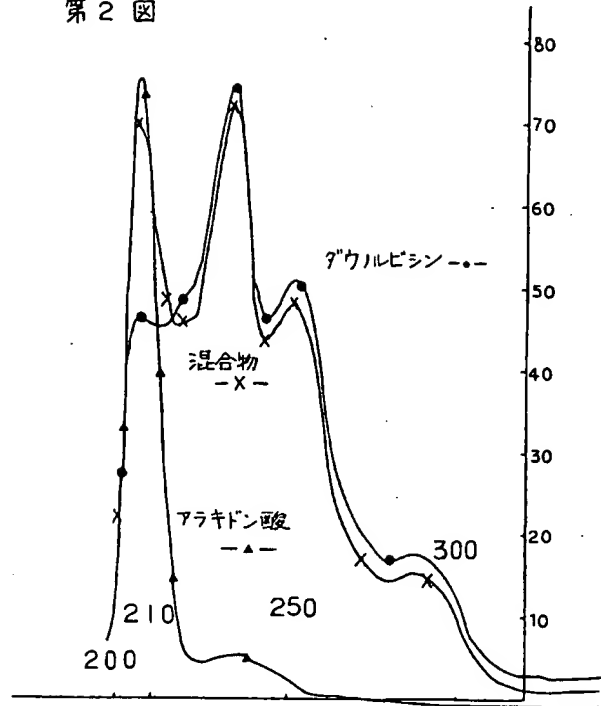
代 理 人 弁 理 士 高 島 一



第1図



第2図



手続補正書 (自発)

昭和57年10月17日

特許庁長官

殿

1. 事件の表示

昭和57年特許第133958号

2. 発明の名称 抗腫瘍性複合体の製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

氏名

氏名(名称) 平井 芳 弘

4. 代理人

〒541

住 所 大阪市東区炭路町2丁目40の3

大塚第一ビル7階 電話(06) 227-1156

氏 名 高島国際特許事務所
弁護士(8079) 高島 一

5. 補正命令の日付

6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄7.10.18



8. 補正の内容

1. 明細書第3頁、第15行の「ドキソルビン」の後に「アドリアマイシン」を加入する。
2. 同書第4頁、下から第3行の「ドキソルビン」の後に「アドリアマイシン」を加入する。
3. 同書第7頁、下から第3行の「静脈内」を「腹腔内」に訂正する。